

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

## 化學與生化農藥感測器及印刷式感測器之發展策略研究

(1/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2113-M-032-013-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：淡江大學化學系

計畫主持人：林孟山

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 6 月 3 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫期中進度報告

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※※

※

※

※

化學與生化農藥感測器及印刷式

※

※

感測器之發展策略研究(1/3)

※

※

※

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

※※

計畫類別：■個別型計畫      □整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2113-M-032-013-

執行期間：91年08月01日至92年07月31

日

計畫主持人：林孟山 教授

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- ☐赴國外出差或研習心得報告一份
- ☐赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- ☐出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- ☐國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：淡江大學化學系

中 華 民 國 九 十 二 年 五 月 三 十 日

研究人力費：

第二年：

本年度新進一名博士班研究生蔣依岑，將協助光電化學系統整合於農藥生化感測器的開發，故惠請再增博士班人力費共**新台幣 96,000 元**。

金額單位：新台幣元

(一) 專任助理、講師及助教級兼任助理、臨時工資						
類別/級別	人數	姓名	工作月數	月支酬金	小計	請述明：1.最高學歷 2.曾擔任專題研究計畫專任助理之經歷 3.在本計畫內擔任之具體工作性質、項目及範圍
合 計 (一)						
(二) 博士班研究生、碩士班研究生及大專學生兼任助理						
級別或姓名	人數 (1)	每人每月單元 數(2)	獎助月 數(3)	小計(4)= \$ 2000×(1)×(2)×(3)	在本研究計畫內擔任之具體 工 作 性 質 、 項 目 及 範 圍	
博士班研究生	2+1	4	12	288,000	執行計劃、操作實驗、收集數據及文獻、實驗室管理、撰寫實驗報告	
碩士班研究生	5	3	12	360,000	執行計劃、操作實驗、收集數據及文獻、實驗室管理、撰寫實驗報告	
合 計 (二)					648,000	
總計 (三) = 合計 (一) + 合計 (二)					648,000	

其他費用：

第二年：額外須增加之計畫經費

金額單

位：新台幣元

名稱 (中文/英文)	說明	金額	經費來源	
			本會補助經費需求	提供配合款之機構名稱及金額
光電系統相關配件	1.遠端機械控制光圈系統、光學支持桿架、固定架...等相關配件	150,000		
	2.數據擷取卡，石英 cell、電極固定座..等	150,000		
合計		300,000	300,000	

詳細說明：

本年度計畫除發展電化學農藥化學及生化感測器外，將增加加入**電生成化學放光**(Electrogenated Chemiluminescence, ECL)技術來開發農藥感測器，以解決各類農藥的殘留量，使偵測手段更具靈活性。並著手將系統發展成可**遙控式**(Remote-controlled)之**自動化設備**，使偵測系統具多樣性，以達成各類型農藥偵測的目的。自動化設備實驗選擇在 FIA 系統中進行，因為其具備快速篩選可偵測樣品的優異特性有此項工具後，我們將致力研究開發上述型態的農藥感測器。

上述系統目前還有些執行困難之處，原因是實驗室上年度經費短缺，雖已獲得**淡江大學經費的補助(25 萬)**，具備了 ECL 系統最基本上所需的光電倍增管(含燈管、燈管放置盒、高壓電源供應器及光電流放大器)、光學桌和暗房等設備，初步已實架一光學系統初步可做 ECL，但仍缺許多配件其**所需經費共 30 萬**，還須配合光學用之配件如支持桿架固定架、鏡片架、可遙控之光圈開關，以及電化學與光化學結合時所必備的相關配件(如石英 cell、電極固定座等)，以完成整個完善的電生成化學放光農藥偵測系統。相信在適當的光學元件配合下，不管是耗材的損耗率及系統操控之方便性，都有相當程度上的改善。此外，我們更企圖的把 **ECL 與遙控式 FIA 系統**整合，需要許多的軟硬體工具來幫助，因此還須國科會在此方面經費再給予最高的支持，可預期整個計畫的成果會相當豐碩。

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 91-2113-M-032-013-

執行期限：91 年 8 月 01 日至 92 年 7 月 31 日

主持人：林孟山 執行機構及單位名稱：淡江大學化學系

## 一、中文摘要

有機磷類農藥是一種目前廣泛被使用的殺蟲劑，此類農藥具有高藥效及快速分解的優點，但是有機磷農藥的毒性很高，會破壞生物體的神經系統，嚴重者會導致中毒或死亡；本研究分析的大滅松是屬於有機磷殺蟲劑，常使用於核果類及柑橘類的農作物上，由於此殺蟲劑本身與其水解代謝後產物均具有很高的毒性，而且都有致癌的危險，因此希望發展出兼具及時與準確的偵測系統，以完成一個穩定且高靈敏度的農藥化學感測器。

本實驗主要是利用鈷？青素(Cobalt Phthalocyanine)與印刷碳墨混和修飾於玻璃碳旋轉電極上，成功的在+100mV(vs. Ag/AgCl)低干擾電位下測定大滅松的水解產物，而得到氧化電流訊號，並以安培法定量大滅松之濃度。在最佳化的條件下，其可分析之線性範圍為 0.15 M ~ 2.4 M ( $R=0.9997$ )，偵測極限可達 20.93nM ( $S/N=3$ )，在連續二十次重複測定 1.0 M 大滅松的實驗中，相對標準偏差為 1.02%，響應時間為 2.1 秒，於環境中常見之干擾物的存在下進行農藥分析，結果證實干擾程度皆小於 1.0%，由此可說明本系統具有很高的精確度，不容易受外界環境的影響，對於發展真實樣品之偵測有很大的貢獻。

以鈷？青素修飾電極所發展出來的大滅松化學感測器具有迅速、穩定、靈敏及低干擾的優點，且其分析特性符合美國環境保護署對大滅松殺蟲劑安全殘餘劑量的偵測要求，未來或可將此分析系統微小化就可發展成簡易而靈敏的農藥感測器。

**關鍵字：**有機磷殺蟲劑，化學感測器，鈷？青素，大滅松

## Abstract

Organophosphate insecticides are widely used in many agriculture applications. Organophosphates had the advantage of effectiveness and high decomposing rate. However, both of organophosphate and its metabolites possess high neurotoxin. In a severe case, organophosphate pesticides may result in cholinesterase inhibition and/or death. Dimethoate, one of the organophosphorus pesticides, was used in citrus fruits and of many produce. Both of dimethoate and its metabolite possess high toxicity and carcinogens. The demand of developing a stable and sensitive scheme is, thus urgently

needed.

The detection scheme was based on the basis of cobalt phthalocyanine (CoPC) can catalyze the oxidation of electrode. A suitable quantity of CoPC modified ink was pipetted onto a polished GC electrode and air-dried. An operational potential of +100mV (vs. Ag/AgCl) was used to detect dimethoate. In the optimum condition, the linearity is up to 2.4 M with correlation coefficient of 0.9997 and the detection limit of dimethoate is 20.93nM (S/N=3). Its relative standard deviation is 1.02% at a series of twenty repetitive measurements and the response time is 2.1 seconds. The scheme is very precise with low interference advantage. Other advantage includes stable and sensitive characteristics. These sensitive schemes meet the requirement of the residue of dimethoate of US EPA.

**Keywords:** Cobalt Phthalocyanine, Organo- phosphorus, Dimethoate, Modified Electrode

## 二、緣由與目的

殺蟲劑是使用最頻繁的農藥，對人類與環境的影響也較大，因此第二年計畫的重心在研發大部分殺蟲劑農藥的偵測可行性，以下將先對殺蟲劑作初步的介紹：殺蟲機能可分為胃毒劑與觸殺劑，胃毒劑是利用消化器官吸收而導致中毒死亡，例如：巴拉松、大滅松等；另一類觸殺劑是透過膚滲透後吸收而中毒死亡，例如：除蟲菊、撲滅松等。若依成分可分為無機殺蟲劑和有機殺蟲劑，無機殺蟲劑大多含有砷、汞、鎘、氟等，有機殺蟲劑的成分為有機氯、有機磷、有機錫、氨基甲酸鹽等。殺蟲劑作用方式的種類較複雜，其中最常見的作用是農藥與乙醯膽鹼酯？(Acetylcholinesterase，幫助神經傳導的重要物質)結合<sup>(i)</sup>，造成神經突觸堆積大量的乙醯膽鹼酯，導致過度刺激而昏迷或死亡，此類農藥包含有機磷劑、氨基甲酸鹽、植物性殺蟲劑等；另一類是干擾、抑制細胞內氧化磷酸化的過程，阻礙 ATP 等能量儲存分子的形成<sup>(ii,iii)</sup>，例如：無機砷化物、有機錫劑等；至於無機氟化物則是與細胞內酵素所含有的鈣、鎂離子結合<sup>(iv)</sup>，破壞酵素功能導致生物體死亡；最後一個是已經被禁用的有機氯農藥，此類殺蟲劑能破壞神經系統，造成生物體肌肉抽筋或死亡，而此類殺蟲劑的效能廣泛，曾經被人類大量的使用，其中最具有代表性的是 DDT<sup>(v,vi)</sup>。日常生活中最常接觸到的農藥殺蟲劑主要分成兩大類：第一類是有機氯殺蟲劑，另一類是有機磷殺蟲劑；凡舉穀類、蔬菜、水果等，都是屬於殺蟲劑應用的範圍，所以殺蟲劑常對人體健康造成很大的危害，因此本計畫的第二年將針對殺蟲劑農藥進行偵測，並以最常使用的有機氯殺蟲劑及有機磷殺蟲劑作為發展農藥電化學感測器的目標，以下對這兩類殺蟲劑的特性及分析方法做更進一步的介紹。

有機氯農藥(Organochlorine Pesticide, OCPs)是個很穩定的物質，在動物體內



及環境中不易分解，藉由動物體食入受到污染的農作物而積蓄在脂肪組織裡，這個現象會隨著食物鏈中生物所屬層級越高而越嚴重，當食物鏈金字塔頂端的生物吃到被有機氯污染過的食物，這些有毒的物質便急速地累加在食物鏈金字塔頂端的動物體內，而造成嚴重的毒害<sup>(vii)</sup>；人類在食物鏈中所扮演角色就屬於金字塔頂端的動物，人類攝食的範圍很廣，包括穀類、蔬菜、水果、家禽、家畜等等，很容易就累積了過量的毒素而造成中毒的現象，因此對食物的安全要格外的小心謹慎。一般有機氯中毒會產生中樞神經症狀，且中毒後沒有任何特效藥可以解毒，而嚴重中毒者會導致昏迷或死亡，由於有機氯農藥殘留及毒性的問題無法解決，因此國際間早已禁止使用此類的農藥，從民國 2001 年起，更被規定除試驗、研究、教育外，一律禁止使用，國內已盡可能的防堵其運作來源，以杜絕持久性有機氯污染物質對人體健康及環境污染的危害。

由於有機氯是屬於長效性(persistence)的農藥，為脂溶性(lipophilic)而具生物累積性(bioaccumulation)，亦為環境荷爾蒙(environmental estrogens)的一種。殘留在環境中的時間相當長，不易分解、代謝，可透過食物、水源及皮膚接觸等，進入生物體而造成累積。根據研究指出，長期暴露於高濃度的有機氯化學物質，會增加產生畸形兒的比例、不孕、智能減退、免疫力降低、慢性病及致癌<sup>(viii-ix)</sup>等機率，此外有機氯農藥的毒性皆屬於劇毒性，也會干擾中樞神經系統<sup>(x-xi)</sup>的正常運作造成中毒。而累積在人體組織內的有機氯，亦可經由母體臍帶之傳輸進入胎兒，或由母乳傳給幼兒，增加幼兒暴露在有機氯污染的機會，因此有機氯對胎兒的影響亦令人擔憂。

有機氯農藥如：滴滴涕 (DDT)、阿特靈 (Aldrin) 和四氯異苯晴 (Chlororthalonil)，可用於甘薯、煙草和蔬果等作物。對人體的毒性屬非急性，但由於這類含氯有機物相當穩定，會於人體組織內長期累積，會對神經系統造成破壞，因此是高毒性農藥，長期高劑量的暴露於有機物氯物質下更會導致肝臟腫瘤，最後，更有導致癌症的可能<sup>(xii)</sup>。目前已遭禁用的農藥中，DDT 和六氯苯 (Benzenehexachloride, BHC) 二種農藥在土壤中的穩定性便長達二、三十年，然而農藥的慢性毒性卻一直到六十年代初期才被提出<sup>(xiii)</sup>，原因是鳥類在吃了含有二氯二苯基三氯乙烷 (Di-chloro-di-phenyl-tri-chloro-ethane, DDT) 農藥的昆蟲後，所產下蛋的蛋殼是軟的，無法承受母鳥孵化時的體重而破裂，造成鳥類瀕臨絕跡，各國政府於是開始警覺到農藥殘留的嚴重性，並積極地展開農藥慢性毒性的評估工作。如今，農藥殘留問題是世界性的問題，世界各國的農產品、河川、湖泊受到農藥污染的報導時有所聞，可見農藥的濫用已使得人類得採取更積極的防備措施<sup>(xiv-xvi)</sup>。

有機氯化合物的持久性不易被分解、且具有揮發特性，可釋放於大氣中而經由沉降作用回到地面上，這樣轉移現象一再反覆進行，使得這些化合物經由大氣傳播而遍佈世界每個角落，累積在食物鏈中，並長期滯留於自然環境中，毒害我們自己。近幾年的研究報告中指出，在曾經使用過有機氯農藥的地區中，無論是畜牧業、漁業甚至是人體內均已檢驗出有機氯農藥的含量；在墨西哥的牛乳中無論是事先採集的鮮乳或瓶裝的牛乳均檢驗出 HCH 分別達到 0.094 及 0.093mg/kg，而 DDT 也檢驗出高達 0.159mg/kg, 0.043mg/kg<sup>(xvii)</sup>，在人類的調查中指出在母乳採樣中發現到母乳中殘留有林丹、DDT 等有機氯農藥的殘留，其中 p, p'-DDT 含量的範圍由 0.33μg/l 到 278μg/l<sup>(xviii)</sup>。而在台灣對 12 個牡蠣養殖區對有機氯農藥 DDT 的檢測中發現，在金門及馬祖地區的牡蠣所含的 DDT 含量分別高達 337ng/g、340ng/g (乾燥重量)<sup>(xix)</sup>。另外在北太平洋以及南太平洋信天

翁也發現了大量的有機氯農藥殘留量<sup>(xx)</sup>，顯示出在陸地上使用的有機氯農藥除了由植物轉入動物體內也流入海洋中污染了水循環系統。另也有報導指出有機氯農藥也在收集的空氣樣品中檢測出來<sup>(xxi-xxii)</sup>。

因此在 2000 年 12 月 10 日，聯合國環境部在南非約翰尼斯堡召集全球 122 國代表，達成自 2001 年起全面禁用或嚴格限用十二種持久性有機污染物 (POPs)，其中包括滴滴涕 (DDT)、阿特靈 (Aldrin)、地特靈 (Dieldrin)、安特靈 (Endrin)、飛佈達 (Heptachlor)、蟲必死 (Hexachlorobenzene)、可氣丹 (Chlordane)、滅蟻樂 (Mirex) 等九種有機氯農藥。此外，聯合國環境規畫總署 (UNEP) 計畫將管制持久性有機污染物的相關公約內容，於 2001 年 5 月聯合國大會時，開放聯合國會員國簽署，因此未來 5~10 年內，有機氯農藥之管制將是全球最重要的環保議題之一。

國際上已針對持久性有機污染物進行全面性的調查，根據美國在 2000 年 11 月的調查中發現，美國幾乎所有的食品如蔬果、肉品和乳製品等等，皆受到持久性有機污染物的污染，在單項食品中常含有 3~7 種持久性有機污染物。而歐盟在 2000 年底發表的研究報告指出，歐洲地區所出產的魚類，其戴奧辛含量最高可達其他非工業地區如秘魯和智利的 8 倍，是歐洲肉類和蛋類的 10 倍。其中肉食性魚類如鮭魚等的戴奧辛含量又比草食性魚類高的多。

儘管我國禁用含有有機氯成分的農藥，部份已超過 20 年，但其生物鏈累積毒性的特性，仍使得這些毒物至今依然存在於環境中。2000 年底衛生署委託檢驗中藥材的農藥殘留時，檢出部分人參中含有有機氯成分<sup>(xxiii)</sup>。在當次檢驗中於 94 個樣品中發現 13 件殘留有有機氯農藥。殘留濃度從 6~2270ppb。其中 10 個樣品驗出殘留蟲必死濃度在 0.1~0.6ppm、7 個樣品殘留有飛佈達濃度約 0.03ppm、7 個樣品中殘留安殺番濃度約 0.06ppm、均超過標準值數倍，另 4 個樣品殘留 DDT 的濃度約為 0.003~0.004ppm。

此外環境品質文教基金會公布 2000 年 9 月台灣大新竹地區魚類的檢測資料顯示<sup>(77)</sup>，採樣的 30 種市售魚類體內，檢出有機氯農藥殘留的比例高達 47%，其中 13% 含量超出標準。這項研究檢測出含有有機氯農藥的魚類共有 14 種，總濃度最高達 1.792ppm。依各種農藥含量超出標準而言，其中火口魚的有機氯含量，超出澳洲的滴滴涕限量標準；象魚超出聯合國的阿特靈和我國的安殺番限量標準；日本鹹魚超出澳洲的地特靈限量標準，鮭魚也超出澳洲的地特靈限量標準，共有 4 種魚超出限量標準，而國內目前對持久性有機污染物的相關資料仍相當的有限。另外，大陸地區目前仍在使用部份的有機氯殺蟲劑，其中安特靈及 DDT 已禁用，但阿特靈、地特靈、可氣丹及飛佈達及毒殺芬仍未禁用。從上所述，去年國內市售人參一成以上檢出有機氯且殘留量偏高及魚類體內有機氯農藥殘留的比例高達百分之 47%，不合格率 13% 來看，國內有必要針對有機氯污染物做更進一步的檢測，尤其是針對來自大陸的中藥材、農產品及其它食材，以確保國人食用上的安全。

基於上述，有機氯農藥檢測實在為刻不容緩的工作，各國對其國內或周遭環境有機氯農藥的含量越來越重視，不斷的進行環境的檢測以監控有機氯農藥的殘留情形，生物學家也紛紛對現有的物種進行有機氯農藥的生物檢測，以致近年來農藥的分析工作如雨後春筍般地展開，我們將這些分析法分別描述如下：

Ling, Y. C. 和 Huang, I. P. 利用氣相層析 (GC) 與電子捕捉偵檢器 (Electron-Capture Detector, ECD) 發展出有機氯農藥的偵測<sup>(xxiv)</sup>，電子捕捉偵檢器的感應有選擇性，對於含陰電性的官能基擁有很高的靈敏度，此類官能基包含鹵

素、過氧化物及硝基等，因此農藥的偵測具有多樣化的特性。

Schechter, I.<sup>(xxv)</sup> 為了分析水溶液中 DDT-type 的污染物，研究發展出將 DDT 衍生化成螢光活性物，並以螢光偵測法定量之。研究中選擇 methoxychlor 之 DDT-type 農藥當分析物，讓其與 Nile red(9-diethylamino-5H-benzo[ $\alpha$ ]phenoxazine-5-one)混合，便會生成一複合體且具新的螢光吸收峰於  $\lambda=663\text{nm}$ (Nile red 本來的螢光吸收在  $\lambda=605\text{nm}$ )，因為極性增強(polarization enhancement)的緣故，此新複合體的螢光吸收强度高，有利於 methoxychlor 的定量，可偵測線性範圍的 methoxychlor 濃度在  $1\sim7\mu\text{g ml}^{-1}$ 。研究結果中也顯示此偵測法所並不受相似農藥 Atrazine(6-chloro-N-ethyl-N-isopropyl-1,3,5-triazine-3,4-amine)、2,4-dichlorophen oxyacetic acid(2,4-D)及 pentachloronitrobenzene(PCNB)干擾的優越選擇性。

其他各式各樣針對不同種類農藥所發展的量測技術不斷地被報導出來，最常使用的方法莫過於氣相層析法(Gas Chromatography, GC)和高效能液相層析法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)等分離技術，配合以不同的偵測系統，來達成農藥定性與定量的分析結果，例如：紫外光與可見光光譜儀(UV-Vis Spectrometer)<sup>(xxvi)</sup>、質譜儀(Mass Spectrometer)<sup>(xxvii)</sup>、電子捕捉偵測器(Electron Capture Detector, ECD)<sup>(78)</sup>、原子放射光譜儀(Atomic Emission Spectro-meter)<sup>(xxviii)</sup>和電化學偵測器(Electrochemical Detector)<sup>(xxix)</sup>等，可知目前的有機氯農藥分析方法皆須使用較繁複或昂貴的偵測器，而目前所發展出的電化學偵測器皆有系統不穩定及選擇性差的缺點，所以在有機氯農藥電化學偵測器的開發實在是一門重要的工作。

接著介紹有機磷農藥(Organophosphate Pesticide, OPPs)，它是目前被廣泛使用的農藥，具有強烈刺激性蒜臭味，容易經由腸胃道、呼吸道及皮膚的吸收而造成中毒的現象，有機磷的致毒機轉為抑制乙醯膽鹼酯？(Acetylcholinesterase)的作用<sup>(xxx)</sup>，使生物體內的乙醯膽鹼(Acetylcholine)無法分解成乙醯輔？-A(Acetyl-Co-A)及膽鹼(Choline)，乙醯膽鹼為人體內神經傳導的重要物質，乙醯膽鹼酯？就是把乙醯膽鹼分解成不具活性的化合物，以避免乙醯膽鹼聚集在神經突觸造成過度刺激或昏迷的中毒症狀。有機磷中毒症狀依時間的不同可分為三種：

1. 急性毒性：暴露於有機磷環境中 12 小時內。
  - a. 蕁毒作用(Muscarinic Effect)：心搏過慢、低血壓、支氣管痙攣和分泌增加，汗腺、淚腺、唾液腺分泌增加，瞳孔縮小、上吐下瀉等症狀<sup>(xxxi)</sup>。
  - b. 尼古丁作用(Nicotinic Effect)：肌肉強烈收縮、新搏過速、血壓上升等症狀<sup>(xxxii)</sup>。
  - c. 中樞神經作用(CNS Effect)：煩躁不安、昏迷暈眩、暈動失調等症狀。
2. 亞急性毒性(間期症候群)：中毒後 1-4 天發生，主要症狀有頸部肌肉及四肢無力，腦神經有可能受到傷害。
3. 慢性毒性(遲發性神經病變)：暴露於有機磷環境中 8-14 天後，主要症狀為下肢對稱性麻痺、肌肉疼痛並且無力。

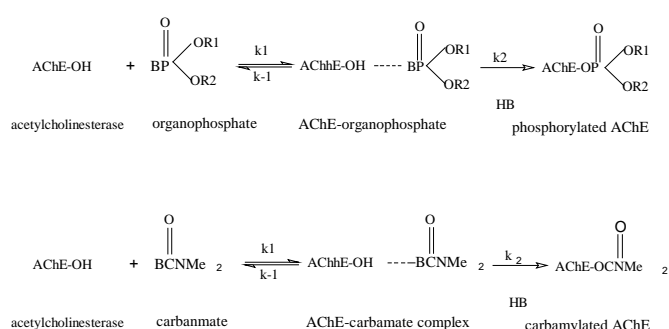
由於有機磷農藥對環境及人體較不易造成累積性的傷害，使其被廣泛且大量的使用，但有機磷農藥所具有的高毒性特質卻不容忽視，除了遵照安全規定使用以外，最重要的是發展一個簡易且精確的分析方法來檢驗食物中殘留農藥之含量，才能夠為自己的健康把關。

Timo Hamers<sup>(xxxiii)</sup>等人利用化學發光現象能偵測數種有機磷系列農藥及氨基甲酸鹽類的農藥，發光的原理是採用 *Vibrio Fischeri* 弧菌與分析物結合形成生物發光(Bioluminescence)系統，並將此技術應用於真實樣品(雨水)的偵測上，在樣品分析前採用 HPLC 層析技術使雨水先透過 C-18 管柱來分離，在分離過程中分別使用 Acetone、Dichloromethane 及 Hexane 三種有機溶液沖提，此方法可增加分析的效果並提高鑑別率，唯一的問題是樣品處理過程太繁瑣不符合簡單、迅速的分析要求。

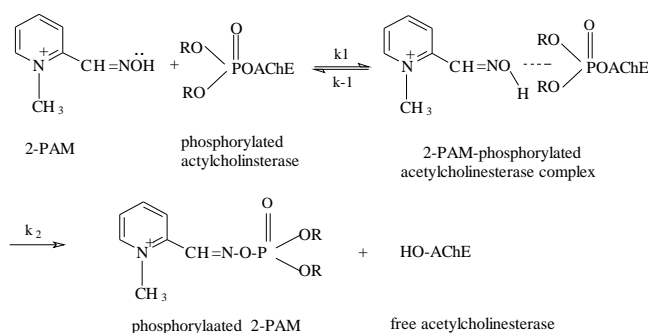
Terreni, M.等人先利用固相萃取法(Solid-Phase Extraction)和氣相層析法(GC)分離農藥的混合物<sup>(xxxiv)</sup>，再利用原子光譜原理中的氮磷偵檢器(Nitrogen-Phosphorus Detector)或稱為熱離子偵檢器(Thermionic Detector)來分析有機磷農藥，這種分析方法對含氮或磷的有機磷系列農藥相當有用，能夠有很高的靈敏度，而環保署對有機磷農藥的標準檢定方法也正是採用這種技術<sup>(xxxv)</sup>。

此外，Teresa, G. D.等利用 HPLC-ECD 方式偵測 4-Nitrophenol, 4,6-Dinitro-o-cresol, Parathion-methyl, Parathion-ethyl, Fenitrothion and 3-Methyl-4-nitrophenol 六種化合物<sup>(xxxvi)</sup>，其中 3-Methyl-4-nitrophenol 和 4-Nitrophenol 分別為 Fenitrothion, Parathion-methyl 及 Parathion-ethyl 三種農藥的代謝產物，這兩種代謝產物結構相似且具有電活性，因此可以選擇電化學方式進行偵測，實驗的部份分為二階段，第一階段採用庫倫法(Coulometric)在工作電極上施加電位為+1300mV(Ag/AgCl)七分鐘將系統中的干擾物清除以利分析物的還原和偵測。第二階段為流注系統並加入雙工作電極，流注分析系統可以改善電極被毒化的現象，上游電極施加電位為-1300mV(Ag/AgCl)以清除氧氣的干擾，下游電極施加電位為+700mV(Ag/AgCl)負責定量偵測農藥，此種電化學分析法最大的缺點就是對分析物沒有選擇性，很容易受到干擾物的影響而失去精確性，至於 Martinez, R. C.也是利用相同原理偵測 Methyl-Parathion, Ethyl-Parathion, Fenitrothion, Paraoxon and Guthion 五種有機磷類的農藥<sup>(xxxvii)</sup>。

由前人研究得知 organophosphorus and carbamate pesticide 皆屬於神經性農藥，因此會抑制神經傳遞元酵素 acetylcholinesterase 的正常代謝，也因此受到醫學界的重視。



在整個抑制的過程當中，可以使用 2-pyrimidine aldoxime methiodide (2-PAM) 來活化遭受抑制之酵素，使得此一系統可以繼續使用。因此再利用 inhibition 測定農藥後可以此試劑再活化 sensor，反應如下：



根據上述的原理，早在 1984 年，Patrick Durand 及 Daniel Thomas<sup>(xxxviii)</sup>便將 Acetylcholinesterase 固定於碳電極表面，利用 Organophosphates 或 Carbamates pesticides 與 acetylcholine 對酵素的競爭反應引起的抑制作用，藉由偵測訊號的減少而可定量出所加入的農藥含量。利用 Acetylcholinesterase 來偵測農藥的研究，到了 1997 年，又有 Marci Mascini 等人將此一技術製成印刷電極( screen-printed electrodes )<sup>(xxxix)</sup>。在 +700mV，pH=9，1% acetronitrile 的 borate 緩衝溶液中，測得 carbofuran 的偵測極限為 2μg/l。另外，更以實際樣品來作偵測，其靈敏度比目前所採用的標準方法還要來得靈敏。

1998 年 E. Lorenzo 等人更將此一技術，發展至壓電型電極上<sup>(xl)</sup>。利用固定在石英晶體微量天平( quartz crystal microbalance )表面上的 acetylcholinesterase 製成可偵測有機磷類( organophosphorus )及氨基甲酸鹽類( carbamate )農藥的生物感測器。其原理是利用 3-indolyl acetate 會被 acetylcholinesterase 催化，而在石英面上形成藍紫色的非水溶性染料，因而造成石英震盪頻率的改變。此時若加入這些農藥則會因形成競爭性反應，使得這些藍紫色染料產物的生成量減少，造成訊號的改變。在預濃縮( preconcentration ) 5 分鐘後，藉由這種方法可以測得 paroxon 與 carbaryl 農藥的線性範圍各為  $5.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{M}$  及  $1.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-5} \text{M}$ 。此二者之偵測極限各為  $5.0 \times 10^{-8} \text{M}$  及  $1.0 \times 10^{-7} \text{M}$ 。

Legret<sup>(xli)</sup>的研究群將 acetylcholinesterase 固定於一可供拋光的含碳環氧樹脂( Graphite-Epoxy Matrix)的間質中，用來發展安培式有機磷及 carbamate 農藥生化感測器(Amperometric organophosphorus and carbamate pesticide biosensor)，當 Graphite-Epoxy 修飾電極的電位控制於 +700mV(vs Ag/AgCl, pH 7 0.1M phosphate with 0.1M KCl solution)，便可得到 Thiocholine 的氧化訊號。但加入 organophosphorus and carbamate 農藥後，發現系統得到 steady-state current 的速率變的緩慢且訊號降低，因此，藉由偵測酵素對 Thiocholine 的活性降低，便可推算出所加入 organophosphorus and carbamate 農藥的濃度。

Andres and Narayanaswamy<sup>(xlii)</sup>透過測量 acetylcholinesterase 的活性，來達到偵測 organophosphorus and carbamate pesticide 的目的。他們所利用的原理如下：

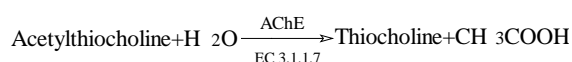
acetylcholine chloride + acetylcholinesterase  $\longrightarrow$   
 [acetylcholine-acetylcholinesterase complex]  $\longrightarrow$   
 acetylated acetylcholinesterase + choline chloride  
 acetylated acetylcholinesterasesymbol  $\longrightarrow$  acetic acid+free acetylcholinesterase

Thymol blue 的吸收波長會隨溶液之酸鹼值而改變，為一種隨著酸鹼度不同而改變顏色的染料，當  $\text{H}^+$  濃度增加時，Thymol blue 將由藍綠色轉變為黃色，因此將偵測器之波長定在 600nm，便可觀測得酵素之活性。因此，當 organophosphorus and carbamate pesticide 濃度提高時，則酵素對受質的活性便降

低，因此我們可以藉由此得到一反比之訊號。但利用抑制機制之生化感測器都有一共同的缺點，就是偵測的上限濃度受到抑制，無法得到較長之線性範圍。

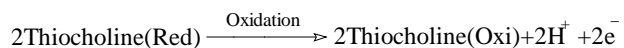
Barcelo<sup>(xliii)</sup>等人則利用酵素 acetylcholinesterase 固定在 HPLC 電化學偵測器之玻璃碳工作電極上，並施加電位+410mV，測量酵素反應所生成之產物來顯示酵素之活性，藉此來分析 organophosphorus and carbamate pesticide。其工作原理與前述同當 organophosphorus and carbamate pesticide 的農藥分子進入分析系統時，迅速地與酵素結合並進而抑制酵素對其受質之代謝作用，使得 Thiocholine 的生成濃度降低，在外加+410mV 下，所得的電流隨抑制作用的加強而遞減，因此可以得到濃度對電流的反向曲線圖。

Miquel, A. S.等使用印刷修飾電極配合安培法(Amperometry)發展出農藥生化感測器<sup>(xliv)</sup>，這是有機磷類農藥(OPPs)常用的偵測方式，主要的反應機制為有機磷農藥會抑制乙醯膽鹼酯？(Acetylcholinesterase, EC 3.1.1.7, AChE)的作用，乙醯膽鹼酯？(AChE)可以將 Acetylthiocholine 水解成 Thiocholine，其反應機制如下：



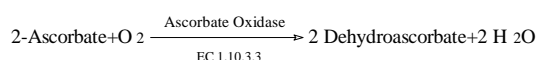
乙醯膽鹼酯？含量多寡會直接影響反應生成物的濃度(Thiocholine)，所以由 Thiocholine 的濃度可以間接定量有機磷農藥的含量，只是二者之間的關係是成反比，一般稱這種方法為抑制性的定量偵測法。

由以下的反應方程式可知，如果利用電化學原理在分析系統中施加氧化電位，就可得到 Thiocholine 的氧化電流訊號，訊號的大小會反比於有機磷農藥的濃度，以此方法就可以定量偵測出有機磷類農藥的濃度。



Miquel, A. S.等人之研究正是利用上述原理進行有機磷類農藥的偵測，而他們更進一步的將電化學三電極系統製作成厚膜(Thick-Film)印刷電極，以進行微小化的快速偵測方式，並針對自來水及果汁樣品作探討。

以上的生化感測器的發展皆是利用抑制乙醯膽鹼酯？的作用來行有機磷農藥的分析，而 Rekha, K.等利用有機磷農藥抑制酵素的方法發展出生化感測電極<sup>(xlv)</sup>，採用的酵素是 Ascorbate Oxidase 有別於一般常見的乙醯膽鹼酯？，其反應機制如下：



有機磷農類的藥會抑制 Ascorbate Oxidase (EC 1.10.3.3)的活性，降低反應中 Ascorbate 轉換成 Dehydroascorbate 的比例，以 Dehydroascorbate 濃度的變化間接定量農藥的濃度，此方法可以應用在乙基巴拉松農藥(Ethyl-Paraoxon)的量測，而響應時間為 120 秒。

Pierre Labbe 等人則是利用電聚合( electropolymerization )的方法<sup>(xlvii)</sup>，將 tyrosinase 與 pyrrole amphiphilic monomer 以電化學沉積的方式，在 0.1M LiClO<sub>4</sub> 水溶液中以+0.75V 的電壓( vs. SCE )沉積在電極表面製成 bioelectrode。此電極應用來偵測 carbamate pesticides 與 atrazine 時，其偵測極限可達 2 mM、4 mM。W. Russell Everett 和 Garry A. Rechnitz<sup>(xlviii)</sup>也利用 tyrosinase 製成的 biosensor 來測量 organophosphorus pesticides。其電極製法是事先在 1.0 M NaOH 中以+1.5V 的電

壓處理後，加上酵素再予以交聯固定在電極表面。製作完成的電極以 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate 當作酵素與電極間之 mediator，此時若加入 organophosphorus pesticides 會與其競爭酵素的反應位置，使得 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate 氧化後的產物減少，造成電極上測得的電流減小。以計時安培分析法(chronoamperometry)在-150mV 下分析 diazinon 與 dichlorvos 的濃度，得到 5 $\mu$ M 與 75nM 的偵測極限。

目前農藥的生化感測器幾乎都是利用有機磷或氨基甲酸鹽類農藥會抑制酵素活性的特性所發展出來的，這類的生化感測器已經漸漸的採用厚膜印刷電極當作量測的工具<sup>(xlviii)</sup>，厚膜印刷電極具有輕巧、便宜、方便攜帶等特性，若將電化學系統縮小化就能成功的發展出攜帶型農藥偵測器，以方便隨時量測及監控農作物的農藥殘餘量，可讓我們的飲食更有安全保障。但是，抑制作用的選擇性較差，當環境中酸鹼值的改變或有干擾物存在等都會對酵素產生抑制的作用，造成偵測系統中不穩定因素的來源，要如何改善分析的專一性(Specificity)是農藥生化感測器所面臨的最大問題。

### 三、結果與討論：

本研究主要是希望能設計一方法得以迅速測定有機磷類農藥，並在低干擾的情況下進行大滅松農藥的定量偵測，以避免大部分干擾物種之影響，最後選擇了鈷？青素當催化劑以達到上述目的；使用含有鈷？青素修飾劑能對於水解後的大滅松有明顯的催化作用，因此可以在較低的偵測電位下量測到大滅松水解產物氧化之訊號，如此降低偵測電位便能夠有效改善干擾物對電化學系統之影響，以達到精確量測的目的。

#### (1) 鈷？青素催化大滅松的機制與特性

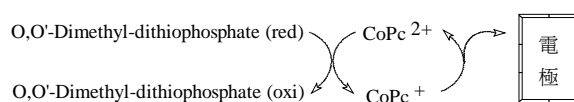
##### (a) 鈷？青素修飾電極催化大滅松的機制

由於本研究係利用鈷？青素催化大滅松的水解產物以進行氧化分析，因此在討論催化機制前應先探討大滅松水解的條件及水解後的產物，以利於了解鈷？青素的催化機制。

從大滅松的特性及過去的文獻中可知此種殺蟲劑在鹼性條件下易發生水解反應，其水解後的產物為 *O,O*-dimethyl-phosphorothioate 而本實驗就是直接偵測大滅松水解後的產物，因此水解速率的快慢及水解比例的多寡會影響分析結果的靈敏度，所以實驗上使用紫外光光譜儀來進行探討；圖一為 0.5mM Dimethoate(in Glycine Buffer pH 12.0 在波長 200nm~800nm 間的吸收光譜圖，在波長 223nm 處有一吸收峰，利用量測時間差的方式就可以比較出，此吸收峰就是大滅松水解後產物的吸收峰。圖二同時顯示了在 0.05M pH 8.0、pH 10.0、pH12.0 的甘胺酸緩衝溶液，各取 10mL 加入含有 2.3mg 的大滅松農藥中混和均勻，在加入緩衝溶液的同時以碼表計時，於配製完成的 5 分鐘後放入光譜儀中偵測，並將吸收波長定在 223nm 以定量方式做偵測，之後每 15 分鐘量測一次，總共量測 9 次並將數值紀錄下來，其他不同酸鹼值的農藥樣品依同樣方法操作，最後將結果製成圖二。此圖為大滅松在不同酸鹼值下水解的速率，由此可以看出當水解環境在 pH 12.0 時水解速率最快，超過 90 分鐘以後訊號大小幾乎達到穩定的狀態，在水解後的 5 小時再度進行偵測，訊號強度仍然維持不變(此數據並未顯示在圖上)，所以我們可以選定以 90 分鐘的條件下進行後續實驗的分析與操作。

此外，為了證明鈷？青素修飾電極是量測大滅松的水解產物，而不是直接偵測大滅松農藥，因此進一步設計了一個實驗，就是利用循環伏安法的原理分析比較在相同濃度和固定的水解時間下 pH 7.0 及 pH 12.0 之循環伏安圖，結果如圖三所示；根據文獻指出大滅松能穩定的處在 pH 2.0~pH 7.0 的酸鹼值條件下<sup>(xlix)</sup>，而 pH 9.0 的 DT<sub>50</sub>(水解後濃度為原物質濃度的一半所需之時間)為 12 天，由此結果可知大滅松處於鹼性條件下會加速水解，且水解速率隨著酸鹼值的增加而增大，本實驗的圖二也同時驗證了這個現象。圖三(a)為大滅松農藥溶於 0.05M pH 7.0 甘胺酸溶液 90 分鐘的循環伏安圖，圖三(b)為大滅松溶於 0.05M pH 12.0 甘胺酸 90 分鐘的循環伏安圖，由圖中氧化電位方向上可以很明顯的分辨出溶於 pH 12.0 的大滅松可以被鈷？青素修飾電極偵測到，而溶於 pH 7.0 的大滅松卻無法被量測到訊號，因此可以證明鈷？青素修飾電極所量測到的訊號是與大滅松水解後的產物相關，而非直接量測大滅松農藥。

圖四為加入水解後大滅松之濃度為 0.5mM(a)及不含大滅松農藥之情況下的循環伏安圖(b)，由此圖可以證明鈷？青素具有直接催化大滅松水解產物的能力，並得到氧化電流訊號，將此圖與未修飾電極所測到的循環伏安圖相比(圖五)，結果發現未修飾電極無法偵測到訊號，而鈷？青素修飾電極則可以測到農藥的氧化電流訊號，並且其電流值會隨著濃度的增加而增大(圖六)，在大滅松水解產物濃度分別為 0mM(a)、0.2mM(b)、0.4mM(c)和 0.6mM(d)時，在 0.05M pH=10.5 的甘胺酸緩衝溶液，電位 E=+0.5V~-0.2V (vs. Ag/AgCl)間作掃描所得到的循環伏安圖，由循環伏安圖可以看出鈷？青素修飾劑與反應物在電子能量上的分佈關係，藉此可判定出鈷？青素具有催化大滅松水解產物的能力，並依此結果來推測大滅松的水解反應及鈷？青素催化大滅松水解產物的反應機制：



## (b) 電子傳遞速率 $k$ 值的探討

為了評估鈷？青素存在下與印刷碳墨對大滅松水解產物之電子傳遞速率的影響，所以設計了這個實驗，本實驗藉由改變動電極的轉速，並利用安培法量測大滅松的氧化電流，將不同轉速所得到的氧化電流值取倒數，對轉速的開根號值之倒數作圖，即  $1/i$  對  $\omega^{-1/2}$  作圖，根據實驗所得到的數據計算其線性的方程式，利用此方程式在圖中的截距就可求出反應速率常數，為了更進一步解釋反應速率常數的計算方法，將採用很簡單的方程式來推導出結果，其公式的應用與意義如下：

$$i_{l,c} = 0.62nFAD^{2/3} \omega^{1/2} \nu^{-1/6} C$$

上式為 Levich equation，此方程式主要是說明在旋轉電極系統上有足夠的反應物濃度供電極進行催化作用時，擴散極限電流( $i_{l,c}$ )會與轉速的二分之一次方成正比，此為質傳(Mass-Transfer)控制的範圍；但是當質傳速率提升到一定程度之後擴散極限電流就達到動力學(Kinetic)所控制的電流區域，我們就可採用 Koutecky-Levich 方程式來求出擴散極限電流( $i_{l,c}$ )、動力催化電流( $i_k$ )與總電流( $i$ )之間的關係。

$$1/i = 1/i_k + 1/i_{l,c}$$

從此方程式可看出當擴散極限電流( $i_{l,c}$ )趨近極大值時總電流( $i$ )的變化主要來自於動力催化電流( $i_k$ )，因此可以得到一個新的方程式稱為 Koutecky-Levich



equation :

$$1/i = 1/i_k + (1/0.62nFAD^{2/3}v^{-1/6}C)^{-1} \quad -1/2$$

當  $1/i$  對  $v^{-1/2}$  作圖，其線性方程式與 Y 軸的截距就是  $1/i_k$ ，而電子傳遞速率  $k$  值就可以由  $i_k = FkC$  來求出。

實驗中分別比較了鈷？青素與印刷碳墨的電子傳遞速率，結果如圖七所示；經過計算鈷？青素修飾劑的電子傳遞速率  $k$  為  $8.205 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$  而印刷碳墨的電子傳遞速率  $k$  為  $0.295 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$  (此實驗結果並未顯示於圖上)，本實驗操作的條件，偵測電位為  $E=0.1 \text{ V}$  (vs.  $\text{Ag/AgCl}$ )，玻璃碳旋轉電極半徑  $r=0.25 \text{ cm}$ ，分析物的濃度  $C=2 \text{ M}$ ，鈷？青素在動力學控制條件下的電流值  $i_{kCoPC}=361.01 \text{ nA}$ ，印刷碳墨修飾電極在動力學控制條件下的電流值  $i_{kBare}=17.91 \text{ nA}$ 。

由上述結果顯示鈷？青素修飾電極的電子傳遞速率比純印刷碳墨修飾電極高出 27 倍以上，若以動力催化電流來比較二者之間的差異為 20.2 倍，這數據顯示鈷？青素能加強分析物與電極之間的電子傳遞，以化學動力學的觀點而言，此現象證明了鈷？青素對大減松水解產物具有顯著的催化作用，能夠增加分析系統的靈敏度及縮短偵測的時間。

### (c) 質傳行為模式的探討

為了瞭解電化學系統中質傳的行為，因此藉由循環伏安法以改變掃描速度的方式進行研究，根據實驗的結果進行分析，以利判斷電化學系統中質傳現象的行為模式。

在電化學系統中質傳行為主要可分為二種模式：(一)分析物靠擴散現象達到電極與電極面上的修飾物發生氧化還原反應所得到的電流訊號。這個現象可以利用線性掃描伏安法(Linear Sweep Voltammetry)方程式來說明。

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C v^{1/2}$$

當反應電流由擴散現象控制時，在相同的操作電位下擴散係數( $D$ )是常數，在相同的反應系統下電子轉移數( $n$ )不變，電極面積( $A$ )與反應物的初始濃度( $C$ )都是可藉由人為操作的方式加以控制，因此這二種參數可視為固定不變，依據上述條件(3-4 式)中  $(2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} C$  在相同的操作條件下可視為常數，因此電流正比於掃描速率的開根號值，如果將方程式的兩邊同時取對數並以  $\log i$  對  $\log v$  作圖，對此圖作線性迴歸分析，並求出一個線性方程式，以此線性方程式的斜率來判斷質傳行為的模式，若分析系統中質傳現象完全是由擴散所造成，則方程式的斜率應為 0.5。

但斜率數值為 1 時則顯現了吸附或表面的現象，而方程式的斜率若介在 0.5 到 1.0 間，表示系統的響應(Response)混合有擴散和吸附的現象，因此可藉由改變循環伏安法的掃描速度所得到的結果，進一步分析系統中質傳行為進行的模式，並以微觀的角度瞭解整個電化學反應的發生行為。

本實驗的操作條件：工作電極為 10%(w/w)鈷？青素修飾於玻璃碳旋轉電極上、電解質為 0.05M，pH 10.50 甘胺酸緩衝溶液，分析物濃度為 2 M，利用循環伏安法掃描電位設定在 +500mV~-100mV(vs.  $\text{Ag/AgCl}$ )，掃描速率(Scan rate)分別為 12.5mV/s、25mV/s、37.5mV/s、50mV/s、62.5mV/s 及 75mV/s 六種速率，紀錄下實驗結果並以  $\log i$  (氧化峰位電流的對數值)對  $\log v$  (掃描速率的對數值)作圖(如圖八)，並對採樣數據作線性迴歸分析找出線性方程式，最後求出此方程式的斜率(slop)。

根據實驗數據所求得的斜率為 0.44597，將此結果並導入上述的觀點就可以

知道，鈷？青素修飾電極所偵測到的電流訊號，主要是藉由大減松水解後產物擴散至電極面而被偵測到的，表示鈷？青素與大減松間發生電化學反應，此電化學反應的速度相當快，以至於吸附或表面的現象不明顯。

## (2) 大減松化學感測器的偵測最佳化條件

進行了鈷？青素修飾劑對偵測大減松可行性的評估之後，為了使大減松化學感測器具有更高的靈敏度、更好的再現性及穩定性，因此針對各項操作條件如：催化劑組成、偵測電位、電極轉速、電解質種類、電解質的酸鹼度、電解質的濃度等作探討，當所有的操作條件都最佳化後，依據此最佳化條件進行分析特性的評估及探討干擾物對分析系統的影響。

### (a) 催化劑的組成

本實驗是利用鈷？青素修飾劑催化水解後的大減松，此方法與未修飾電極相比不但可以增加分析的靈敏度並且能夠降低偵測的電位，因此催化劑的多寡除了會影響到偵測靈敏度之外也會直接影響到催化農藥的能力，而碳墨在本研究中具有固定催化劑與傳導電子的作用，其中碳墨的含量會隨催化劑比例的增加而減少。在本實驗中分別探討 2.5%、5.0%、10% 及 15% 的催化劑比例。

在探討組成比例前先說明電極的製備過程，首先將鈷？青素與碳墨依上述比例混和均勻，再加入環己酮當稀釋劑混入鈷？青素碳墨中，而稀釋劑重量固定為鈷？青素碳墨總重的 9 倍，取 1L 鈷？青素碳墨混和溶液滴於旋轉玻璃碳電極上，放在室溫中乾燥 20 分鐘，待乾燥好之電極置於包含 0.05M、pH 10.5 甘胺酸緩衝溶液的電化學反應槽中，施加電位為 +100mV(vs. Ag/AgCl)、電極轉速固定在 1600rpm、分析物的濃度為 2 M，並以安培法量測其響應電流；隨後使用相同的條件只改變不同的組成比例所測量到的氧化電流訊號繪製成圖九，由實驗的結果可以看出隨著組成比例的增加電流訊號也越大，但是在較高的組成比例時，其標準偏差及雜訊也跟著變大，推測此現象可能之原因有二個：

第一、當催化劑含量變多時，雜訊的大小會隨著電極面粗糙程度的增加而增大，因為溶液在流經電極面時會形成擾流這些擾流就是雜訊主要的來源之一。

第二、印刷碳墨主要是幫助電子的傳遞並且將修飾劑固定在電極表面上，當修飾劑鈷？青素含量增加時碳墨的含量就逐漸減少，造成修飾劑固定的效果變差，而固定在電極表面修飾劑的含量可能會隨操作次數的增加而發生變化，這可能是造成標準偏差變大的主要原因。至於鈷？青素組成達到一定比例以後訊號增加的現象趨緩，此原因應該是電極面上的鈷？青素修飾劑與大減松水解產物間的作用已經達到飽和，即使再增加催化劑的含量其訊號大小亦不會有太明顯的變化，因此本實驗在催化劑組成比例的探討中選擇 10.0% 作為最佳化的條件。

### (b) 系統的偵測電位

系統的偵測電位對於電化學感測器的發展有著相當重要的關係，其主要原因是系統所提供的偵測電位是否能使我們的分析物發生電化學反應，其次是在此偵測電位下有多少干擾物會影響到整個分析系統的準確性，綜合上述二個原因，只要審慎選擇適當的電位就可以得到最佳的靈敏度及有效避開干擾物的影響。在電化學系統中偵測電位的高低會影響整個化學反應的進行，以本實驗來說，施加較低的氧化電位可能造成反應物無法達到反應所需的活化能而不發生反應或者

是反應進行的速率變得很慢，由於這些問題的存在會導致分析訊號的靈敏度變差或無法有效的偵測，因此選擇適當的偵測電位將扮演著關鍵性的角色。

由實驗結果顯示鈷？青素修飾電極可以催化大減松的水解產物並且得到氧化電流訊號，因此選擇+50mV、+100mV、+150mV 及+200mV(vs. Ag/AgCl)四個電位來探討，結果如圖十所示，在圖中可以很明顯的看出訊號大小會隨著偵測電位的增加而增大，基於分析靈敏度與干擾物影響程度的雙重考量之下選擇了+100mV(vs. Ag/AgCl)當作系統的操作電位。

### (c) 電極轉速效應

鈷？青素修飾之玻璃碳旋轉電極對大減松水解產物進行偵測時，系統中電極轉速與分析物氧化所造成的電流訊號可以用 Levich equation 表示，當轉速慢時，系統中總反應電流與質傳速度相關，但隨著電極轉速的增加分析物靠質傳所產生之電流慢慢的達到飽和，此段過程中電流訊號與電極轉速的根號成正比，然而當電極旋轉速度更快時，分析訊號已經達到質傳的最大極限，電流訊號不再因轉速的增加而變大了，這表示質傳速度不再是控制電流大小的因素，反而取而代之的是動力學控制(Kinetic Control)因素，動力學控制因素與電極轉速無關，因此在這個部分即使提高轉速分析訊號也不會有明顯的變化，而影響動力學控制的因子是改變電位，因此在定電位偵測系統上動力控制因素的可以視為固定值，這個現象也可以在本實驗數據圖十一中觀察到。

由上述可知，電極旋轉速度的增加伴隨著訊號的增大，相對提升了分析的靈敏度，在本實驗中選擇 10.0%(w/w)鈷？青素修飾電極在 0.05M pH 10.5 甘胺酸緩衝溶液中進行轉速的探討，偵測電位  $E=+100\text{mV}$ (vs. Ag/AgCl)、分析物濃度  $C$  為 0.2 M，轉速範圍則控制在 400rpm~3600rpm 間，結果如圖十一所示。

在圖十一中  $y$  軸為  $i_l$ 、 $x$  軸為  $\omega^{1/2}$ ，在此圖中呈現出一個曲線關係，在轉速 400rpm~1600rpm 間氧化電流的增加與電極轉速的開根號呈線性關係，表示此階段為質傳控制(Mass Transfer Control)區，而轉速超過 1600rpm 以上為動力學控制區，本實驗為了減少因質傳因子的改變所造成偵測靈敏度上的影響，所以選擇電極轉速 1600rpm 為本實驗最佳化的條件。

### (d) 電解質酸鹼度的影響

在電化學感測系統中溶液的氫離子或氫氧根離子若有參與反應，則溶液的酸鹼值將會是影響實驗結果的一個重要因素，這個因素也關係著靈敏度的變化；除此之外在有氫離子或氫氧根離子參與反應的系統中分析物的反應電位會隨著酸鹼值的改變而有偏移的現象，此現象可藉由 Nernst equation 推導出來，因此選擇適當的酸鹼值有助於靈敏度的提昇及增加催化劑在系統中的穩定性，反之可能造成系統的再現性不佳。

本實驗以 10%(w/w) 鈷？青素催化劑修飾於玻璃碳旋轉電極上，施加 +100mV(vs. Ag/AgCl)電位下電極轉速固定在 1600rpm，緩衝溶液為 0.05M 的甘胺酸，探討酸鹼值範圍在 pH 7.00~pH 11.00 之間，結果如圖十二所示，圖中顯示電流訊號隨著 pH 值的增加而變大，在氧化的偵測系統下電流訊號會隨著氫離子濃度的降低而增高，但是到了 pH 11.0 標準偏差明顯變大，推測其原因可能是鈷？青素在如此鹼性的條件下分子變得不穩定，造成每次量測訊號間的變異性增大以及再現性不佳的問題。最後選擇靈敏度與再現性較好的 pH 10.5 緩衝溶液作為最佳化條件，至於電解質的種類將在下一節中做更進一步的討論與研究。

### (e) 電解質的種類

由於上述實驗選擇了 pH 10.5 作為緩衝溶液酸鹼值的最佳化條件，因此要選擇在此鹼性條件下具有緩衝能力的電解質，因為大減松水解的最佳化條件是 pH 12.00，如果選擇了在鹼性條件下無緩衝能力的電解質，在實驗過程中溶液的酸鹼值將會隨著分析物濃度的增加而改變，並造成分析上不可控制的誤差。在本實驗中選擇了三種在 pH 10.5 時還具有較佳緩衝能力的電解質，分別為磷酸(Phosphate)、甘胺酸(Glycine)及硼酸(Borate)緩衝溶液。

實驗上使用 10% 鈷？青素修飾電極、偵測電位  $E=+100\text{mV}$ (vs. Ag/AgCl)、電極轉速為 1600rpm、電解質濃度固定在 0.05M，而分析物大減松則分別溶於與電解質相同且 pH=12.0 的溶液中，配製好的溶液以攪拌子攪拌 10 分鐘後靜置 5 分鐘才開始量測，量測間隔為 15 分鐘、總共量測 7 次，其餘二種緩衝溶液分別依照相同方法量測，並將結果顯示於圖十三，在圖中有三條曲線分別為 Glycine、Phosphate 及 Borate，大減松水解產物在甘胺酸緩衝溶液下測得的訊號最大，而硼酸緩衝溶液的訊號很明顯的比起其他二種緩衝溶液還小，而且在大減松發生水解反應 45 分鐘後訊號就沒有明顯的增加，由此可知硼酸緩衝溶液的靈敏度遠低於磷酸及甘胺酸，這對化學分析而言是一項不利的因素。

綜合上述原因就可以知道在甘胺酸緩衝溶液下操作能獲得最大的電流訊號，可能的原因是當電極施加電位時會吸引緩衝溶液分子靠近電極面，而有些分子與電極面的距離相當的近，造成阻礙分析物與催化劑之間的交互作用，而導致電流訊號的下降；然而磷酸與硼酸的分子形狀偏向球形，阻礙的作用會大於具有較多孔隙的甘胺酸長形分子，使得系統在甘胺酸緩衝溶液下能獲得較高的訊號，進而提升分析的靈敏度，所以在本系統中最佳化的電解質就是甘胺酸(Glycine)緩衝溶液。

### (f) 電解質的濃度

電解質在溶液中扮演傳遞電子的角色，當電解質濃度較低時，偵測系統會因為導電度較差而造成分析訊號下降，相反的，電解質濃度太高時，電解質分子可能會阻礙分析物接近電極面而影響反應的發生，因此要選擇適當的電解質濃度才不會影響分析系統的訊號及靈敏度。

實驗的部分則使用含 10% 鈷？青素修飾劑的玻璃碳旋轉電極當工作電極，施加電位  $+100\text{mV}$ (vs. Ag/AgCl)，電極轉速 1600rpm，緩衝溶液選擇 pH 10.50 甘胺酸，電解質濃度從 0.01M 到 0.09M，結果如圖十四所示。

根據實驗結果顯示濃度範圍在 0.01M 到 0.05M 之間氧化電流訊號會隨著電解質濃度的增加而急速增大，但是當電解質的濃度高於 0.05M 之後氧化電流訊號逐漸趨於平穩狀態，為了擁有最佳的導電度及不妨礙電子傳遞的情況下，因此選擇 0.05M 的甘胺酸緩衝溶液為本系統的最佳電解質濃度。

## (3) 大減松化學感測器的分析特性

基於上述偵測系統最佳化的探討結果，接著進行分析特性之評估，在此之前先將最佳化的條件分列如下：工作電極的部份，將 10%(w/w)鈷？青素與印刷碳墨相混和，以 1:9 的比例加入稀釋劑-環己酮均勻混入鈷？青素碳墨中。緩衝溶液則選擇 0.05M、pH 10.50 的甘胺酸(Glycine)緩衝溶液。最重要的是大減松水解條件，取 2.3mg 的大減松溶於 10mL 的 0.05M、pH 12.0 甘胺酸緩衝溶液中，充分混和均勻，靜置 90 分鐘，即可製成 0.1mM Dimethoate 大減松溶液。本實驗

最佳化的操作電位為： $+100\text{mV}(\text{vs. Ag/AgCl})$ ，電極轉速則固定在  $1600\text{rpm}$ 。

#### (a) 大減松化學感測器的分析特性探討

分析特性的評估可分為下列幾個項目：線性範圍之研究、偵測極限、響應時間、重複操作之相對標準偏差等，根據這些分析特性的實驗結果，可以使我們更清楚的瞭解大減松化學感測器所具有的優點及缺點。

線性範圍之研究是在最佳化的條件之下連續添加  $0.15\text{ M}$ (大減松水解後的濃度) 20 次，其線性範圍介於  $0.15\text{ M}\sim 2.4\text{ M}$ ，相關係數(Correlation Coefficient, R) 為  $0.9997$ ，在此線性範圍內的電流密度(Current Density) 為  $460.63\text{nA}/\text{M}\times\text{cm}^2$ ，所謂電流密度也就是分析系統的靈敏度，本實驗的數據及校正曲線如圖十五所示。

偵測極限(Detection Limit)在  $S/N=3$  時可達  $20.93\text{nM}$ ，以  $1.0\text{ M}$ (大減松完全水解後的濃度)做連續的重複偵測 20 次所得到的相對標準偏差(RSD) 為  $1.02\%$ (結果如圖十六所示)。另外，在安培法電流訊號達  $10\%\sim 90\%$ 間所需的響應時間(Response Time)為  $2.1$  秒，上述分析特性的結果都列在表一。

#### (b) 干擾物的測定

良好的電化學感測器不但要具有高靈敏度、長的線性範圍、低的偵測極限、快速的響應時間、良好的穩定性及對分析物要具有的專一性，所謂專一性就是對分析物有選擇的能力，只選擇要分析的目標才進行偵測，其他的物質都應排除在外，惟有如此才是理想的化學感測器，因此我們要評估其他物質對本分析系統的影響，這些物質就稱為干擾物。

可作為干擾物的物質非常多，因此要選擇具有代表性及常見的干擾物來分析，在本實驗中選擇下列幾種常見的干擾物質並對干擾物質作一個簡短說明。

界面活性劑：界面活性劑具有親水基及親油基，可以將油性及水性這二種不同性質的物質混和在一起，因此界面活性劑是一種帶有電荷的分子，以電化學系統而言 SDS 常會吸附在電極的表面，造成質傳的障礙，其中最常見的就是清潔劑，清潔劑的主要作用就是幫助油脂溶於水中，而 SDS 就是其中一個典型的代表，所以本實驗選擇 SDS 作為分析的干擾物。

樟腦(Camphor)：有機大分子的代表，在我們生活的週遭中常見到它的存在，對於廚櫃的防蟲非常有效，在電化學系統中有機大分子常會阻礙質傳的進行，造成訊號的衰減，因此選擇樟腦作為阻礙質傳進行的代表物。此外，腐質酸(Humic Acid)是一種常存在於土壤及腐爛植物中的物質，極易溶於鹼性環境下，是一種常見的易氧化物質，而本實驗是在氧化的電位下進行偵測，因此更要仔細評估腐質酸對系統的影響。

在環境中及飲用水裡最常被偵測到的金屬離子就是鐵離子、銅離子及鎳離子等，這些金屬離子的存在常會干擾系統的偵測，所以我們就評估上述三種離子對系統的影響性。

測定干擾物的實驗設計如下，取  $10\%(\text{w/w})$  鈷？青素修飾在玻璃碳旋轉電極上，偵測電位為  $+100\text{mV}(\text{vs. Ag/AgCl})$ 、電極轉速固定在  $1600\text{rpm}$  並於  $0.05\text{M}$ , pH 10.5 的甘胺酸緩衝溶液下操作，本實驗所使用的干擾物濃度為  $1\text{ppm}$  SDS、 $1\text{ppm}$  Camphor、 $1\text{ppm}$  Humic acid、 $2\text{ M}$   $\text{Fe}^{2+}$ 、 $2\text{ M}$   $\text{Cu}^{2+}$ 、 $2\text{ M}$   $\text{Ni}^{2+}$ ，上述溶液都溶解於  $0.05\text{M}$ , pH 12.0 的甘胺酸緩衝溶液中，並採用先添加大減松再添加干擾物的方式進行偵測，在評估干擾物對分析系統影響的實驗中所使用的大減松濃度為

1.0 M，此大滅松是溶於 0.05M, pH 12.0 的甘胺酸緩衝溶液，並靜置 90 分鐘後使用。

實驗結果顯示，干擾物對系統的影響如下： SDS 1.98%、Camphor 0.98%、Humic acid 3.33%、鐵離子 0.99%、銅離子 1.0%、鎳離子 0.89%，由數據顯示可以看出這些干擾物對本偵測系統並沒有造成太大的影響，因此可以確保在一般環境下偵測的準確性。至於干擾物的整體分析資料將詳列在表二。

#### 四、結果與討論

由實驗結果顯示，鈷？青素具有催化大滅松水解後產物的能力，並且利用鈷？青素修飾電極能夠成功的定量測定大滅松殺蟲劑，以此方法能夠發展出具有快速偵測、高靈敏度及穩定的偵測系統，其分析特性符合美國環境保護署(US EPA)對大滅松殺蟲劑安全殘餘劑量的偵測要求；至於精確度方面本系統擁有低干擾的優點，不容易受到外界環境的影響，對於真實樣品之偵測會有很大的貢獻。

大滅松是一種常見於柑橘類及核果類的殺蟲劑，它本身是一個致癌的物質，並且具有很高的毒性，這種農藥若不當使用會對人體造成很大的傷害，因此利用鈷？青素修飾電極所發展出來的大滅松化學感測器，能夠成功的偵測到極低濃度之大滅松，對於選擇安全的食物有很大的幫助

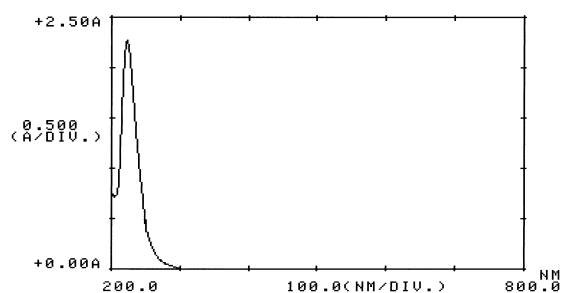
未來希望將此分析系統應用於其他農藥的偵測上，朝著簡易而多元化的方向邁進，發展成快速又簡便的農藥感測器，能夠同時檢測各種有毒的物質或農藥，以達到迅速而精確的偵測目標，除此之外，未來若將本系統微小化就可以讓消費者隨時隨地的監測食物中農藥的殘餘量，達到自我保護的目的以及遏止農藥濫用的問題。

#### 五、計畫成果自評

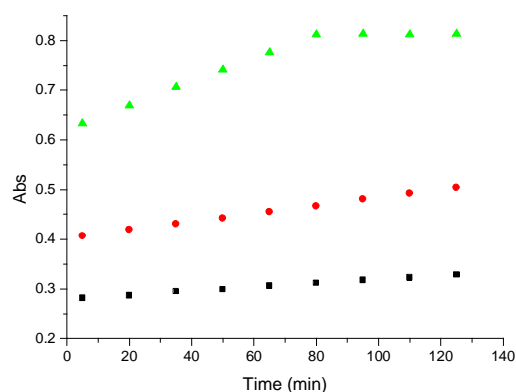
本計畫結果顯示我們已成功發展出實用的大滅松電化學感測器，此系統兼具了迅速、靈敏、簡易且微小化等的多項優異特性，相當有助於發成有機磷農藥感測器，並有效解決了有機磷過去偵測的各項缺點。

基於本年度成功發展此有機磷農藥感測器的經驗，我們相當樂觀於下年度在其他類型農藥感測器的研發，將可奠定大部分農藥的偵測機制及系統，以利達成整個計畫發展成化學與生化農藥感測器及印刷式感測器之目標

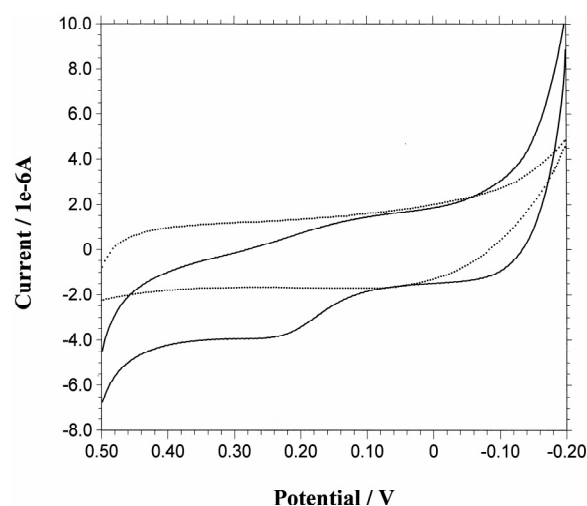
## 六、圖表



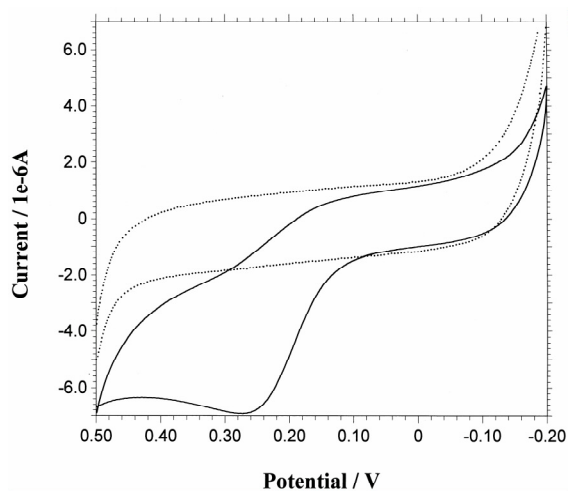
圖一 大減松水解產物之光譜圖。實驗的操作條件為 0.5mM 大減松溶於 0.05M pH=12.0 甘胺酸緩衝溶液中，靜置時間為 90 分鐘，掃描波長範圍在 200nm~800nm 的吸收光譜圖。



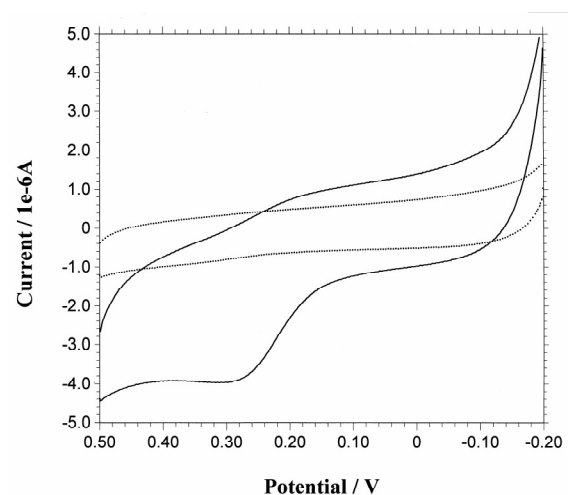
圖二 以吸收光譜法比較在不同酸鹼值下大減松水解的速度。本實驗為 0.2mM 的大減松分別溶於 pH 12.0(▲)、pH 10.0(■)及 pH 8.0(●)之 0.05M 甘胺酸緩衝溶液中，每隔 15 分鐘觀察在 223nm 波長處吸收峰的變化。



圖三 以循環伏安法比較在不同酸鹼值之下對大減松水解的影響。將大減松分別溶於 pH 7.0(a) 及 pH 12.0(b)的 0.05M 甘胺酸緩衝溶液中，混合均勻並靜置 90 分鐘，並以鈷-青素修飾電極於 0.05M, pH 10.5 甘胺酸緩衝溶液中操作，掃描速率 50mV/s，大減松濃度為各為 0.2mM 之循環伏安圖。

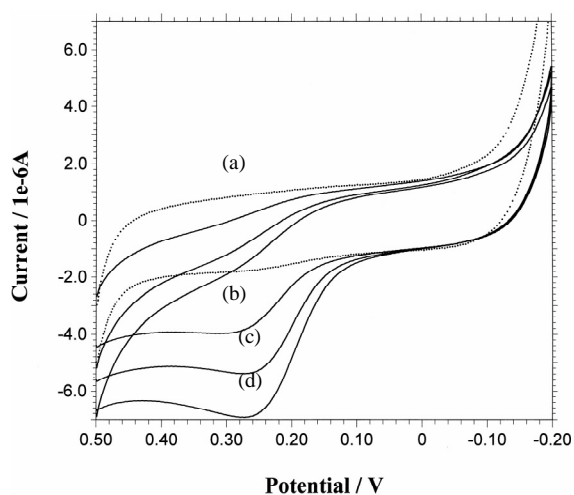


圖四 以循環伏安法來比較鈷？青素修飾電極對大減松的偵測變化。不含大減松(a)；加入 0.5mM 大減松(b)。本實驗是將大減松溶於 0.05M pH 12.0 之甘胺酸緩衝溶液經 90 分鐘的水解時間，在 0.05M pH 10.5 的甘胺酸緩衝溶液下操作，掃描速率為 50mV/s。

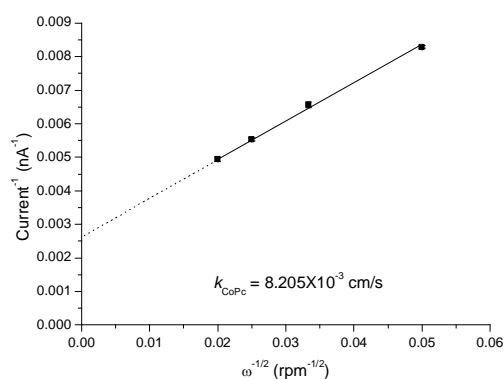


圖五 以循環伏安法來證明鈷？青素的催化作用。鈷？青素修飾電極所得到的循環伏安圖(a)；未修飾電極的循環伏安圖(b)。將大減松溶於 0.05M pH 12.0 的甘胺酸緩衝溶液中 90 分鐘，取 0.2mM 的上述溶液，在 0.05M pH 10.5 的甘胺酸緩衝溶液下操作，掃描速率為 50mV/s。

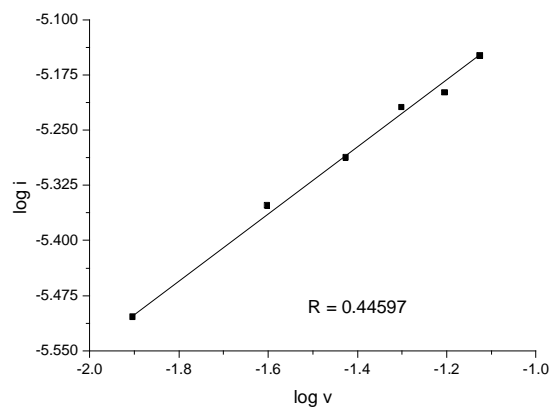




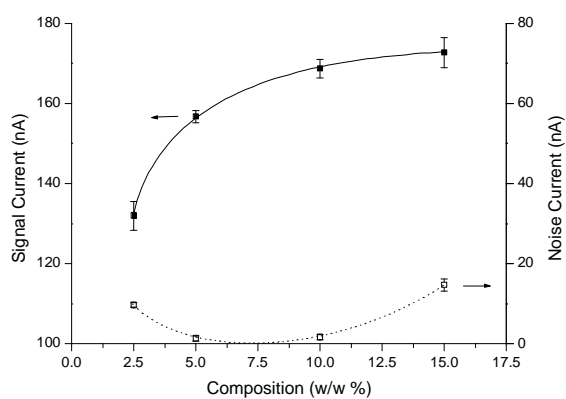
圖六 連續添加大滅松的循環伏安圖。大滅松濃度分別為 0mM(a)、0.2mM(b)、0.4mM(c)和 0.6mM(d)，以鈷？青素修飾電極在 0.05M pH 10.5 的甘胺酸緩衝溶液中操作，掃描速率為 50mV/s 的循環伏安圖。



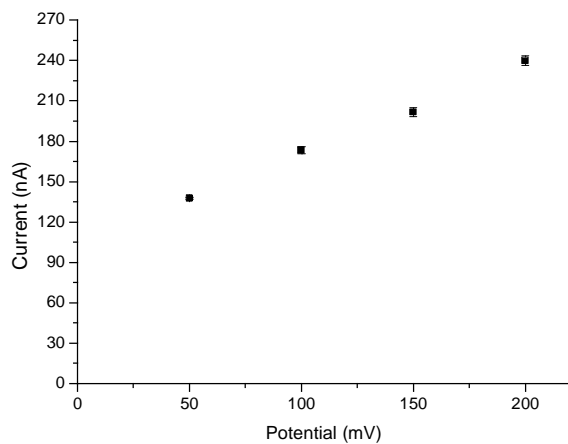
圖七 鈷？青素修飾電極的电子傳遞速率常數。利用安培法在 2 M 大滅松存在的條件下，鈷？青素修飾電極於不同轉速時所得到的電流訊號，並以  $1/i$  對  $\omega^{-1/2}$  作圖。此實驗的操作電位為 +100mV (vs. Ag/AgCl)，電極轉速為 400rpm~2500rpm，0.05M pH 10.5 甘胺酸緩衝溶液。



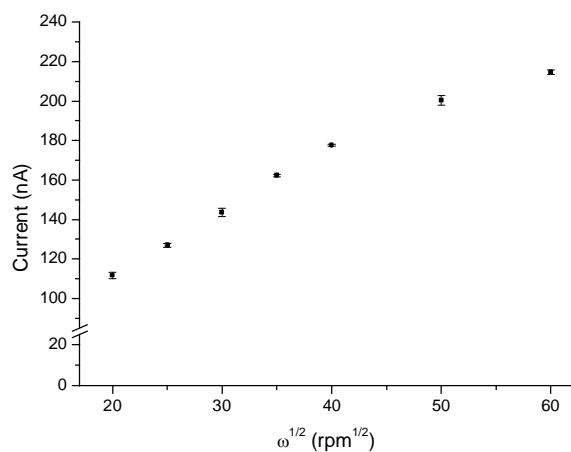
圖八 利用循環伏安法探討大減松的質傳行為模式，將大減松溶於 0.05M, pH 12.0 甘胺酸緩衝溶液均勻混合 90 分鐘後量測之電流訊號，施加電位範圍為+500mV~-100mV (vs. Ag/AgCl)，在 0.05M, pH 10.5 甘胺酸緩衝溶液中進行操作，掃描速率範圍是 25mV/s~75mV/s。



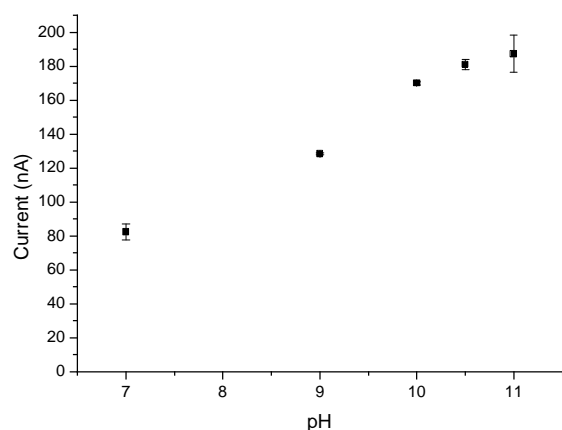
圖九 利用安培法來探討鈷-青素修飾劑的組成比例。實心方塊( )採用左邊 Y 軸，代表大減松水解後的氧化訊號；空心方塊( )採用右邊 Y 軸，代表分析系統中的雜訊電流。鈷-青素與碳墨的組成比例為 2.5%~15% 間，以 2 M 大減松進行分析，操作電位+100mV(vs. Ag/AgCl)，電極轉速 1600rpm，操作條件為 0.05M pH 10.0 甘胺酸緩衝溶液。



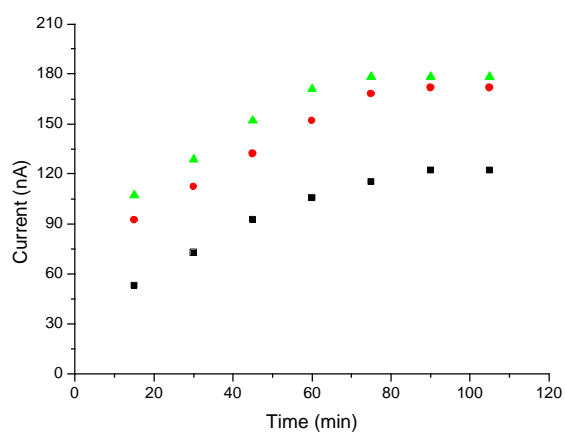
圖十 鈷-酪素修飾電極的操作電位探討。將 10% 鈷-酪素修飾於玻璃碳旋轉電極上在 0.05M pH 10.5 甘胺酸緩衝溶液中操作，施加電位的範圍在+50mV 至+200mV (vs. Ag/AgCl)之間，電極轉速固定在 1600rpm，並以 2 M 大減松進行電位的探討。



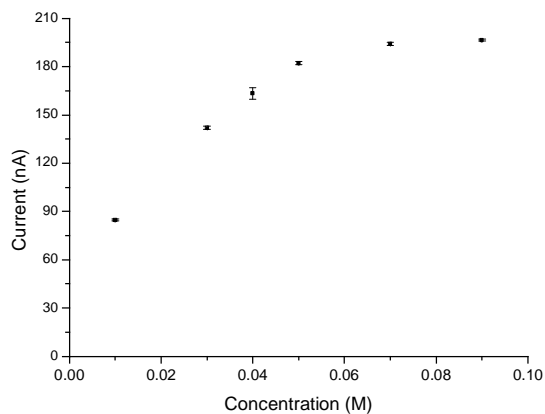
圖十一 鈷-酪素修飾電極的轉速探討。本實驗電極轉速的控制範圍在 400rpm~3600rpm，利用改變電極轉速來探討響應電流與轉速間的關係，其操作條件如下： 0.05M pH 10.5 甘胺酸緩衝溶液，操作電位為+100mV (vs. Ag/AgCl)，大減松濃度 2 M。



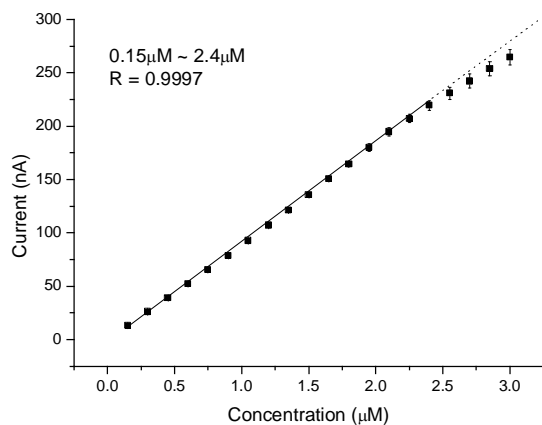
圖十二 探討鈷-青素修飾電極對溶液中氫離子濃度的影響。本實驗選擇 pH 7.0 ~ pH 11.0 的甘氨酸緩衝溶液進行研究，操作的電位為 +100mV (vs. Ag/AgCl)，電解質濃度 0.05M 及加入 2 mM 大滅松，電極轉速則固定於 1600rpm。



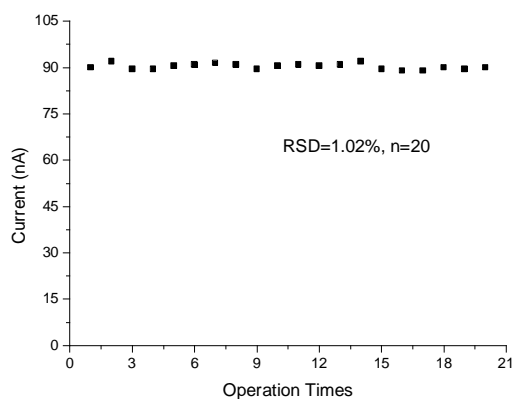
圖十三 緩衝溶液種類與大滅松水解速率的探討。本實驗分別選擇 glycine(▲)、phosphate(●)及 borate(■)三種緩衝溶液進行研究；大滅松的製備條件為，取 2 mM 的大滅松，分別溶於 0.05M pH=12.0 的 glycine、phosphate 及 borate 溶液中，每隔 15 分鐘偵測其氧化的電流訊號，其他操作條件與(圖十一)相同。



圖十四 鈷？青素修飾電極對電解質濃度的探討。選擇 0.01M 到 0.09M 間不同濃度的甘胺酸緩衝溶液進行研究，實驗操作條件如下： 0.05M pH 10.5 甘胺酸緩衝溶液，加入 2 M 大減松，操作電位為 +100mV (vs. Ag/AgCl)，電極轉速 1600rpm，並以安培法進行偵測。



圖十五 鈷？青素修飾電極偵測大減松之校正曲線與實際偵測的電流響應圖。最佳化條件：施加電位  $E=+100\text{mV}$  (vs. Ag/AgCl)、電極轉速 1600rpm、0.05M pH10.5 的甘胺酸緩衝溶液；實驗的操作：連續添加 1.0 M 的大減松溶液，以安培法進行偵測，並得到電流對濃度的關係圖，此外還顯示出實際操作的電流響應圖。



圖十六 探討鈷？青素修飾電在重複操作下的穩定性。以鈷？青素修飾電極連續重複偵測 1.0 M

之大減松 20 次，所得到的相對標準偏差(RSD)。本實驗選擇最佳化的條件進行評估，最佳化的條件如圖十五所述。

【表一】 大滅松化學感測器的分析特性

電極組成	鈷？青素：印刷碳墨＝1：9	
操作電位	+100mV (vs. Ag/AgCl)	
電極轉速	1600rpm	
緩衝溶液	0.05M pH10.5 甘胺酸緩衝溶液	
水解條件	將大滅松溶於 0.05M pH 12.0 的甘胺酸緩衝溶液，水解過程需 90 分鐘	
分析項目	結果	
電流密度	460.63 nA/M · cm <sup>2</sup>	
線性範圍	0.15M~2.4M (R=0.9997)	
偵測極限	20.93nM	(S/N=3)
響應時間	2.1sec	(t <sub>10-90</sub> )
相對標準偏差	1.02%	(n=20)

【表二】 偵測系統的干擾物探討

干擾物	干擾比例 (相對於 1 $\mu$ M 大減松)
SDS	-1.98%
Camphor	-0.98%
Humic Acid	-3.33%
Fe <sup>2+</sup>	-0.99%
Cu <sup>2+</sup>	-1.00%
Ni <sup>2+</sup>	-0.89%

※ 實驗中 SDS、Camphor、Humic Acid 的濃度為 1ppm

※ 本實驗中 Fe<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup>、Ni<sup>2+</sup> 金屬離子的濃度為 2 $\mu$ M

※ 干擾比例為負值表示分析物訊號會受干擾物的影響而衰減



## 七、參考文獻

- 
- <sup>i</sup> Rocha, E. S.; Santos, M. D.; Albuquerque, E. X. *Toxicology and applied Pharmacology*, **1999**, 159, 31.
- <sup>ii</sup> Rohl, C.; Gulden, M.; Seibert, H. *Cell Biology and Toxicology*, **2001**, 17, 23.
- <sup>iii</sup> Lin, Ja-Liang; Hsueh, S. *American Journal of Nephrology*, **1993**, 13, 124.
- <sup>iv</sup> Rubin, C. D.; Pak, C. Y. C.; Adams-Huet, B.; Genant, H. K.; Li, J.; Rao, D. S. *Archives of Internal Medicine*, **2001**, 161, 2325.
- <sup>v</sup> Jaga, K.; Duvvi, H. *Journal Royal Society for the Promotion of Health*, **2001**, 121, 107.
- <sup>vi</sup> 李國欽、林浩潭，「農藥與土壤」，行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所，第十三期專題報導，中華民國七十八年六月。
- <sup>vii</sup> Ellenhorn, M. J.; Barceloux, D. G. *Medical Toxicology*, Elsevier, New York, **1988**.
- <sup>viii</sup> Hunter, D. J.; Hankinson, S. E.; Laden, F.; Colditz, G. A. ; Manson, J. E.; Willett, W. C.; Speizer, F. E. and Wolff, M. S. *The New England Journal of Medicine*, **1997**, 337, 1253.
- <sup>ix</sup> Wolff, M. S.; Berkowitz, G. S.; Brower, S.; Bleiweiss, I. J.; Tartter, P.; Pace, B.; Roy, N.; Wallenstein, S. and Weston, A. *Environmental Research Section A*, **2000**, 84, 151.
- <sup>x</sup> Haider, S and Inbaraj, R. M. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.*, **1986**, 347.
- <sup>xi</sup> Hellwell, M. J. *Environ. Poll.*, **1988**, 61.
- <sup>xii</sup> U.S. Environmental Protection Agency. *Integrated Risk Information System*; Washington, D.C., 1995.
- <sup>xiii</sup> Miller, G. T. Jr. Ed., *Living in the Environment- Principle, Connections, and Solutions*, Wadsworth Publishing Co., Belmont, **1994**, pp. 598.
- <sup>xiv</sup> Senseman, S. A.; Lavy, T. L. and Skulman, B. W. *Environ. Sci. Tech.*, **1997**, 31, 395-399.
- <sup>xv</sup> Hanson, D. Chem. & Engineer. News, May 4, **1998**, 38.
- <sup>xvi</sup> Hileman, B. Chem. & Engineer. News, Nov. 18, **1998**, 24.
- <sup>xvii</sup> Waliszewski, S. M.; Pardío, V. T.; Waliszewski, K. N.; Chantiri, J. N.; Aguirre, A. A.; Infanzón, R. M.; Rivera, J. *The Science of The Total Environment*, 1997, 208, 127.
- <sup>xviii</sup> *Archives of Environmental Health*, 2000, 55, 411.
- <sup>xix</sup> Han, Bor-Cheng; Jeng, Woei-Lih; Hung, Tsu-Chang; Ling, Yong-Chien; Shieh, Ming-Jer; Chien, Ling-Chu. *Environmental Pollution*, 2000, 109, 147.
- <sup>xx</sup> Guruge, K. S.; Watanabe, M.; Tanaka, H.; Tanabe, S. *Environmental Pollution*, 2001, 114, 389.
- <sup>xxi</sup> Alergia, Henry A.; Bidleman, Terry F.; Shaw, Timothy J. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 1953.
- <sup>xxii</sup> Lee, Robert G. M.; Burnett, Victoria; Harner, Tom and Jones, Kevin C. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 393.
- <sup>xxiii</sup> 中國時報，89年12月19日。
- <sup>xxiv</sup> Ling, Y. C.; Huang, I. P. *Journal of Chromatography. A*, **1995**, 695, 75.
- <sup>xxv</sup> Schechter, I.; Hassoon, S. *Anal. Chim. Acta* **1998**, 368, 77.
- <sup>xxvi</sup> Comellas, L.; Lliberia, J. L.; Roca, A. *Journal of chromatography*, **1993**, 655, 57.
- <sup>xxvii</sup> Crespo, C.; Marce, R. M. and Borrull, F. J. *Chromatopr. A*, **1994**, 670, 135.
- <sup>xxviii</sup> Eisert, R.; Levsten, K. and Wunsch, G. J. *Chromatopr. A*, **1994**, 683, 175.
- <sup>xxix</sup> Achilli, G.; Cellerino, G. P.; D'Eril, G. M. and Bird, S. J. *Chromatopr. A*, **1995**,

- 697, 357.
- xxx Hoffman, R. S.; Morasco, R.; Goldfrank, L. R. *Journal of toxicology. clinical toxicology*, **1996**, 34, 259.
- xxxi Liu, W.; Kumar, A.; Alraja, M. *Brain research*, **1998**, 805, 220.
- xxxii Kiss, J. P.; Windisch, K.; De Oliveira, K.; Hennings, E. C. P.; Mike, A.; Szasz, B. *K. Neurochemical Research*, **2001**, 26, 943.
- xxxiii Timo, Hamers; Mathijis, G. D. S.; Albertinka, J. M.; Koeman, Jan H. *Chemosphere*, **2001**, 45, 609.
- xxxiv Terreni, M.; Benfenati, E.; Natangelo, M.; Facchini, G.; Pagani, G. *Journal of Chromatography. A*, **1994**, 668, 243.
- xxxv 中華民國八十九年三月二十日(89)環署檢字第 14669 號公告，NIEA W656.51B
- xxxvi Teresa, G. D.; Agustina, G. C.; Nielene, M. D.; Piedad, P. V.; Francisco, S. L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 4508.
- xxxvii Martinez, R. C.; Gonzalo, E. R.; Garcia, F. G.; Mendez, J. H. *Journal of Chromatography*, **1993**, 644, 49.
- xxxviii Patrick Durand and Daniel Thomas, *Journal of environmental pathology, toxicology, and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, **1984**, 5, 51.
- xxxix Palchetti, I. C.; Andrea, C.; Michele, D. C.; Claudio, M. M. and Turner, A. P. F. *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 337, 315.
- xl Abad, J. M.; Pariente, F.; Hernandez, L.; Abruna, H. D.; Lorenzo, E. *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 2848.
- xli Martorell, D.; Cespeses, F.; E. Martinez-Fabregas and Legret, S. A. *Anal. Chim. Acta*, **1994**, 290, 343.
- xliv Andres, R. T. and Narayanaswamy, R. *Talanta*, **1997**, 49, 13352.
- xliii Barcelo, D.; Lacorte, S. and Marty, J. L. *Trends in Analytical Chemistry*, **1995**, 14, 334.
- xliv Miquel, A. S.; Arben, M.; Salvador, A. *Analytica Chimica Acta*, **2001**, 442, 35.
- xlvi Rekha, K.; Gouda, M. D.; Thakur, M. S.; Karanth, N. G. *Biosensors and Bioelectronics*, **2000**, 15, 499.
- xlvii Besombes, Jean-Luc; Cosnier, S.; Labbe, Pierre and Reverdy, Gilbert *Analytica Chimica Acta*, **1995**, 311, 255.
- xlviii Everett, W. R. and Rechnitz, G. A. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 807.
- xlix Mulchandani, A.; Mulchandani, P.; Chen, L. *Analytical Chemistry*, **1999**, 71, 2246.
- Clive Tomlin, *The Pesticide Manual*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **1994**.